

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10304880 A**

(43) Date of publication of application: **17.11.98**

(51) Int. Cl  
**C12N 15/09**  
**C07H 21/02**  
**C12Q 1/68**  
**G01N 33/50**

(21) Application number: **09277580**

(22) Date of filing: **09.10.97**

(30) Priority: **07.03.97 JP 09 53528**

(71) Applicant: **SHISEIDO CO LTD**

(72) Inventor:  
**HATAO MASATO**  
**ICHIKAWA HIDEYUKI**  
**HARIGAI TAKESHI**  
**TSUDA TAKAYA**  
**SHIBATA MICHIO**

(54) **MEASUREMENT OF NUCLEIC ACID, AND  
REAGENT THEREFOR**

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To estimate allergic activities of a chemical material by measuring an mRNA or a cDNA by using each specific primer and probe, and carrying out a polymerase chain reaction under a specified condition.

SOLUTION: A mRNA or cDNA encoding interleukin-2, interferon- $\gamma$ , interleukin-10, interleukin-12 p35 subunit and interleukin-12 p40 subunit is measured by carrying out a polymerase chain reaction by a DNA polymerase having 5'  $\rightarrow$ 3' exonuclease activities by using a forward primer having a base sequence, etc., of formula I, a reverse primer having a base sequence, etc., of formula II, and a probe having a reporter and a quencher, hybridizing with a template nucleic acid within a region placed between the both primers, and having base sequence, etc., of formula III.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO

5' TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG3'

I

5' GAGTCAAATCCAGAACATGCCGCAG3'

II

5' CAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCT3'

III

(19)日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-304880

(43)公開日 平成10年(1998)11月17日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

識別記号

FI

C12N 15/09

ZNA

C12N 15/00

ZNAA

C07H 21/02

C07H 21/02

C12Q 1/68

C12Q 1/68

A

G01N 33/50

G01N 33/50

P

審査請求 未請求 請求項の数10 OL (全 20 頁)

(21)出願番号 特願平9-277580

(22)出願日 平成9年(1997)10月9日

(31)優先権主張番号 特願平9-53528

(32)優先日 平9(1997)3月7日

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001959

株式会社資生堂

東京都中央区銀座7丁目5番5号

(72)発明者 畑尾 正人

神奈川県横浜市港北区新羽町1050 株式会  
社資生堂第一リサーチセンター内

(72)発明者 市川 秀之

神奈川県横浜市港北区新羽町1050 株式会  
社資生堂第一リサーチセンター内

(72)発明者 針谷 毅

神奈川県横浜市港北区新羽町1050 株式会  
社資生堂第一リサーチセンター内

(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 核酸の測定方法及びそのための試薬

(57)【要約】

【課題】 サイトカイン数をコードする遺伝子の新規な測定方法の提供。

【解決手段】 1対のPCRプライマーと、鋳型上の該プライマーに挟まれた位置にハイブリダイズする、レポーターとクエンチャーを結合したプローブを用いて、PCR法により鋳型としての遺伝子を測定する方法において、特定のプライマーと特定のプローブとを用いて、インターロイキン-2、インターフェロン-γ、インターロイキン-10、インターロイキン-12p35サブユニット及びインターロイキン-12p40サブユニットの各々をコードする遺伝子特にmRNAを測定する方法、並びにそのためのキット。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによってmRNA又はcDNAを測定する方法において、

(1) インターロイキン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-2をコードする核酸のヌクレオチド202~226の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド345~369の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド242~268の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは、(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-2をコードする核酸のヌクレオチド22~43の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド83~105の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド49~74の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；

(2) インターフェロン-γをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてインターフェロン-γをコードする核酸中のヌクレオチド430~450の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド545~564の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド508~530の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；

(3) インターロイキン-10をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-10をコードする核酸中のヌクレオチド381~402の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド630~650の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド431~453の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-10をコードする核酸中のヌクレオチド15~38の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド90~112の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド62~87の領域にハイブリダイ

ズするオリゴヌクレオチドを用い；

(4) インターロイキン-12p35サブユニットをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、

(a)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p35サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド571~594の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド693~714の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド657~680の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは、(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p35サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド62~81の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド208~229の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド118~143の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは

(5) インターロイキン-12p40サブユニットをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、

(a)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p40サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド600~619の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド739~760の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド701~726の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p40サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド199~221の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド430~449の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド333~358の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして、前記プライマー及びプローブが15~35個のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、ことを特徴とするmRNA又はcDNAの測定方法。

【請求項2】 前記プライマー及びプローブが20~30のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記プライマー及びプローブが次のヌクレオチド配列：

インターロイキン-2遺伝子測定用(a)

フォワードプライマー 5' TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG3' (配列番号：7)

リバースプライマー 5' GAGTCAAATCCAGAACATGCCGAG

3' (配列番号: 8)  
 プローブ 5' CAGGAACCTGAACTCCCCAGGATGCT3' (配列番号: 9)  
 インターロイキン-2 遺伝子測定用 (b)  
 フォワードプライマー 5' TCACAGTGACCTCAAGTCCTGC 3' (配列番号: 25)  
 リバースプライマー 5' TGTGACAAGGAGCACAAGTGTC3' (配列番号: 26)  
 プローブ 5' TGTACAGCATGCAGCTCGCATCCTGT 3' (配列番号: 27)  
 インターフェロン- $\gamma$  遺伝子測定用  
 フォワードプライマー 5' GTCAACAACCCACAGGTCCAG 3' (配列番号: 10)  
 リバースプライマー 5' TTGGGACAATCTCTTCCCCA3' (配列番号: 11)  
 プローブ 5' CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG3' (配列番号: 12)  
 インターロイキン-10 遺伝子測定用 (a)  
 フォワードプライマー 5' CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG 3' (配列番号: 13)  
 リバースプライマー 5' CCTGGAGTCCAGCAGACTCAA3' (配列番号: 14)  
 プローブ 5' TCAGGATGCGGCTGAGGCGCTGT3' (配列番号: 15)  
 インターロイキン-10 遺伝子測定用 (b)  
 フォワードプライマー 5' AGAGACTTGCTCTTGCACTACCAA3' (配列番号: 28)  
 リバースプライマー 5' GTAAGAGCAGGCAGCATAGCAGT3' (配列番号: 29)  
 プローブ 5' TGAGCCAGGCATGATGGAGCTCTCTT3' (配列番号: 30)  
 インターロイキン-12 p 35 サブユニット遺伝子測定用 (a)  
 フォワードプライマー 5' ATCATTCTAGACAAGGGCATGTG3' (配列番号: 16)  
 リバースプライマー 5' GTGAAGCAGGATGCAGAGCTTC3' (配列番号: 17)  
 プローブ 5' TAAGGGTCTGCTTCTGCTTCTCCACAGGA3' (配列番号: 18)  
 インターロイキン-12 p 35 サブユニット遺伝子測定用 (b)  
 フォワードプライマー 5' CCAAGGTCAGCGTTCCAACA3' (配列番号: 31)  
 リバースプライマー 5' TAAGACACCTGGCAGGTCCAGA3' (配列番号: 32)  
 プローブ 5' CGGTCCAGCATGTGTCAATCACGCTA3' (配列番号: 33)  
 インターロイキン-12 p 40 サブユニット遺伝子測定用 (a)  
 フォワードプライマー 2 5' TGTCTGCCAGGAGGATGTC

3' (配列番号: 19)  
 リバースプライマー 5' CTCATCTGCAAGTTCTTGGGC3' (配列番号: 20)  
 プローブ 5' ATGATGTCCCTGATGAAGAAGCTGGT3' (配列番号: 21)  
 インターロイキン-12 p 40 サブユニット遺伝子測定用 (b)  
 フォワードプライマー 2 5' AGATGACATCACCTGGACCTCAG3' (配列番号: 34)  
 10 リバースプライマー 5' ACGTGAACCGTCCGGAGTAA3' (配列番号: 35)  
 プローブ 5' TTCCTTCTTGTGGAGCAGCAGATGTG3' (配列番号: 36)  
 を有するか、又は該配列中の4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加により修飾されており、且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を有する、請求項1又は2に記載の方法。  
 【請求項4】 対照としてさらに、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド46~67の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、他方のプライマーとしてヌクレオチド252~271の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、そしてプローブとしてヌクレオチド222~242の領域のオリゴヌクレオチドを用いて、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ遺伝子を測定する、請求項1~3のいずれか1項に記載の方法。  
 20 【請求項5】 前記グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ測定用として、次のヌクレオチド配列:  
 フォワードプライマー 5' AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC 3' (配列番号: 22)  
 リバースプライマー 5' GAAGATGGTGATGGGCTTCC3' (配列番号: 23)  
 プローブ 5' CAAGCTTCCCATTCTCGGCC3' (配列番号: 24)  
 を有するか、又は4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び/又は付加により修飾されており且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブを用いる、請求項4に記載の方法。  
 40 【請求項6】 フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを含んで成る、5'  $\rightarrow$  3' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによってmRNA又はcDNAを測定するためのキットであって、  
 (1) インターロイキン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a) 前記一方のプライマ  
 50



ーとしてインターロイキン-2をコードする核酸のヌクレオチド202~226の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド345~369の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド242~268の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-2をコードする核酸のヌクレオチド22~43の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド83~105の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド49~74の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；

(2) インターフェロニン- $\gamma$ をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてインターフェロニン- $\gamma$ をコードする核酸中のヌクレオチド430~450の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド545~564の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド508~530の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；

(3) インターロイキン-10をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-10をコードする核酸中のヌクレオチド381~402の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド630~650の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド431~453の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、

(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-10をコードする核酸中のヌクレオチド15~38の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド90~112の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド62~87の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；

(4) インターロイキン-12p35サブユニットをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、

(a)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p35サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド571~594の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド693~714の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド657~680の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p35サブ

ユニットをコードする核酸中のヌクレオチド62~81の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド208~229の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド118~143の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは

(5) インターロイキン-12p40サブユニットをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、

10 (a)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p40サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド600~619の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド739~760の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド701~726の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド；あるいは、(b)前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p40サブ  
20 ユニットをコードする核酸中のヌクレオチド199~221の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド430~449の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及び前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド333~358の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、を含み、前記プライマー及びプローブが15~35個のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、ことを特徴とするmRNA又はcDNAの測定用キット。

30 【請求項7】 前記プライマー及びプローブが20~30のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチドである、請求項6に記載のキット。

【請求項8】 前記プライマー及びプローブが次のヌクレオチド配列：

インターロイキン-2遺伝子測定用 (a)

フォワードプライマー 5' TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG3' (配列番号：7)

リバースプライマー 5' GAGTCAAATCCAGAACATGCCGCGAG3' (配列番号：8)

40 プローブ 5' CAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCT3' (配列番号：9)

インターロイキン-2遺伝子測定用 (b)

フォワードプライマー 5' TCACAGTGACCTCAAGTCCTGC3' (配列番号：25)

リバースプライマー 5' TGTGACAAGGAGCACAAGTGTC3' (配列番号：26)

50 プローブ 5' TGTACAGCATGCAGCTCGCATCCTGT3' (配列番号：27)

インターフェロニン- $\gamma$ 遺伝子測定用

フォワードプライマー 5' GTCAACAACCCACAGGTCCAG3' (配列番号：10)

リバースプライマー 5' TTGGACAATCTCTTCCCA3' (配列番号: 11)

プローブ 5' CGACTCCTTTTCCGCTTCCTGAG3' (配列番号: 12)

インターロイキン-10 遺伝子測定用 (a)

フォワードプライマー 5' CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG3' (配列番号: 13)

リバースプライマー 5' CCTGGAGTCCAGCAGACTCAA3' (配列番号: 14)

プローブ 5' TCAGGATGCGGCTGAGGCGCTGT3' (配列番号: 15)

インターロイキン-10 遺伝子測定用 (b)

フォワードプライマー 5' AGAGACTTGCTCTTGCACTACC3' (配列番号: 28)

リバースプライマー 5' GTAAGAGCAGGCAGCATAGCAGT3' (配列番号: 29)

プローブ 5' TGAGCCAGGCATGATGGAGCTCTT3' (配列番号: 30)

インターロイキン-12 p35 サブユニット遺伝子測定用 (a)

フォワードプライマー 5' ATCATTCTAGACAAGGGCATGTG3' (配列番号: 16)

リバースプライマー 5' GTGAAGCAGGATGCAGAGCTTC3' (配列番号: 17)

プローブ 5' TAAGGGTCTGCTTCTGCTTCTCCACAGGA3' (配列番号: 18)

インターロイキン-12 p35 サブユニット遺伝子測定用 (b)

フォワードプライマー 5' CCAAGGTCAGCGTTCCAACA3' (配列番号: 31)

リバースプライマー 5' TAAGACACCTGGCAGGTCCAGA3' (配列番号: 32)

プローブ 5' CGGTCCAGCATGTGTCAATCACGCTA3' (配列番号: 33)

インターロイキン-12 p40 サブユニット遺伝子測定用 (a)

フォワードプライマー 2 5' TGTCTGCCAGGAGGATGTC3' (配列番号: 19)

リバースプライマー 5' CTTTCATCTGCAAGTTCTTGGGC3' (配列番号: 20)

プローブ 5' ATGATGTCCCTGATGAAGAAGCTGGT3' (配列番号: 21)

インターロイキン-12 p40 サブユニット遺伝子測定用 (b)

フォワードプライマー 2 5' AGATGACATCACCTGGACCTCAG3' (配列番号: 34)

リバースプライマー 5' ACGTGAACCGTCCGGAGTAA3' (配列番号: 35)

プローブ 5' TTCCTTCTTGTGGAGCAGCAGATGTG3' (配列番号: 36)

を有するか、又は該配列中の4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており、且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるヌクレオチド配列を有する、請求項6又は7に記載のキット。

【請求項9】 対照としてさらに、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド46～67の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、他方のプライマーとしてヌクレオチド252～271の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチド、及びプローブとしてヌクレオチド222～242の領域のオリゴヌクレオチドを含む請求項6～8のいずれか1項に記載のキット。

【請求項10】 前記グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ測定用として、次のヌクレオチド配列：

フォワードプライマー 5' AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC3' (配列番号: 22)

リバースプライマー 5' GAAGATGGTGATGGGCTTCC3' (配列番号: 23)

プローブ 5' CAAGCTTCCCATTCTCGGCC3' (配列番号: 24)

を有するか、又は4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており且つ対応する領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブを用いる、請求項9に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、特定の生理活性蛋白質のmRNA又はcDNAの測定方法及びそのためのキットに関する。本発明は、例えば化学物質のアレルギー性を評価するための試験方法として有用である。

【0002】

【従来の技術】 ポリメラーゼ連鎖反応法（PCR法）は核酸の増幅方法として広く使用されている。このPCR法の1用途として、リポーター色素1とクエンチャー色素2を結合させたプローブを用いて核酸を測定する方法がある。この方法においては、PCR法において使用するフォワードプライマーがハイブリダイズする鋳型上の部位とリバースプライマーがハイブリダイズする鋳型上の部位とに挟まれた鋳型上の部位にハイブリダイズし、且つリポーター色素1とクエンチャー色素2が結合しているプローブを用い、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼを用いてPCR反応を行う。

【0003】 例えば、図1の(A)～(D)において、フォワードプライマーがDNAポリメラーゼの使用により伸長してプローブに対すると、プローブを構成するオリゴヌクレオチドは、DNAポリメラーゼが有する5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性の作用により分解さ

れ、その後を追ってフォワードプライマーの伸長生成物が生成する。

【0004】この場合、レポーター1とクエンチャー2がプローブに結合している間は近い位置にある両者の相互作用により蛍光を発しないが、プライマーの伸長と共にプローブを構成するオリゴヌクレオチドが分解されればレポーター1とクエンチャー2が切り離され、レポーター1はクエンチャー2の作用を受けないので紫外線の照射により蛍光を発する。従って、特定のDNAに特異的にハイブリダイズするプライマー及びプローブを選択することにより、蛍光強度によって特定の核酸を選択的に測定することができる。この方法はすでにTaqMan PCR (商標) 等として広く使用されている。

#### 【0005】

【発明が解決しようとする課題】上記の方法においては、被験核酸、すなわち鋳型核酸上の上記のごとき位置関係にある1対のプローブ、及びプローブを選択する必要があるが、そののみならず同一のハイブリダイゼーション条件下でプライマーよりも早くプローブが鋳型核酸にハイブリダイズしなければならない。なぜなら、プライマーの伸長生成物(1本鎖核酸)がプローブがハイブリダイズすべき位置を超えて伸長してしまえば、もはやプローブがハイブリダイズすることができず、従ってDNAポリメラーゼの5'→3'エキソヌクレアーゼ活性により分解されることもできないからである。

【0006】特定のヌクレオチド配列が既知である2つの核酸がハイブリダイズする場合のハイブリダイズの生じやすさは、融点(Tm)の算計によりある程度推定することができる。しかしながらこの推定によって選択したプライマーとプローブとの組合せが、必ずしも上記DNA測定法において好結果をもたらすわけではなく、測定すべて特定の核酸につき試行錯誤によりプローブとプライマーの組合わせを選択する必要がある。

【0007】そこで本発明は、アレルギーの発生に必要な関連性を有することが知られているインターロイキン-2(IL-2)、インターフェロン-γ、インターロイキン-10(IL-10)、インターロイキン-12p35サブユニット及びインターロイキン-12p40サブユニットにつき、これらをコードする核酸の測定のために有効なプライマーとプローブとの特定の組合わせを提供しようとするものである。

#### 【0008】

【課題を解決するための手段】上記の課題を解決するため、本発明は、フォワードプライマー及びリバースプライマー、並びにレポーターとクエンチャーを有し前記両プライマーに挟まれた領域内で鋳型核酸とハイブリダイズするプローブを用い、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有するDNAポリメラーゼによりポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによってmRNA又はcDNAを測定する方法において、下記のプライマー対及

びプローブを使用する。

【0009】(1) インターロイキン-2をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a) 前記一方のプライマーとしてインターロイキン-2をコードする核酸のヌクレオチド202~226の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド345~369の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド242~268の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い; あるいは、(b) 前記一方のプライマーとしてインターロイキン-2をコードする核酸のヌクレオチド22~43の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸のヌクレオチド83~105の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド49~74の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0010】インターロイキン-2(IL-2)をコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプローブ結合領域の位置関係を図2の(A)に示す。この図において上流の下線部分がフォワードプライマーがハイブリダイズする領域であり、下流の下線部分がリバースプライマーがハイブリダイズする領域でありそしてそれらに挟まれた中間の下線部分がプローブがハイブリダイズする領域である。インターロイキン-2(IL-2)遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列(a)は次の通りである(図2の(A)の1本下線で示す)。

30 フォワードプライマー 5' TGATGGACCTACAGGAGCTCCTGAG3' (配列番号: 7)

リバースプライマー 5' GAGTCAAATCCAGAACATGCCGAG3' (配列番号: 8)

プローブ 5' CAGGAACCTGAAACTCCCCAGGATGCT3' (配列番号: 9)

インターロイキン-2(IL-2)遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブの他のヌクレオチド配列(b)は次の通りである(図2の(A)の2本下線で示す)。

40 フォワードプライマー 5' TCACAGTGACCTCAAGTCCTGC3' (配列番号: 25)

リバースプライマー 5' TGTTGACAAGGAGCACAAAGTGTC3' (配列番号: 26)

プローブ 5' TGTACAGCATGCAGCTCGCATCCTGT3' (配列番号: 27)

【0011】(2) インターフェロン-γをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、前記一方のプライマーとしてインターフェロン-γをコードする核酸中のヌクレオチド430~450の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーと



して前記核酸中のヌクレオチド545～564の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド508～530の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0012】インターフェロニン-γをコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプローブ結合領域との位置関係を図2のBに示す。この図において、3本の下線の意味は図2の(A)について記載した通りである。インターフェロニン-γ遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである。

フォワードプライマー 5' GTCAACAACCCACAGGTCCAG 3' (配列番号: 10)

リバースプライマー 5' TTGGACAATCTCTTCCCA3' (配列番号: 11)

プローブ 5' CGACTCCTTTTCGCTTCCTGAG3' (配列番号: 12)

【0013】(3) インターロイキン-10をコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a) 前記一方のプライマーとしてインターロイキン-10をコードする核酸中のヌクレオチド381～402の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド630～650の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド431～453の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは、(b) 前記一方のプライマーとしてインターロイキン-10をコードする核酸中のヌクレオチド15～38の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド90～112の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド62～87の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0014】インターロイキン-10 (IL-10) をコードする遺伝子上のプライマー結合領域とプローブ結合領域との位置関係を図3のCに示す。この図において、3本の下線の意味は図2の(A)について記載した通りである。インターロイキン-10遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列

(a) は次の通りである。

フォワードプライマー 5' CCCAGAAATCAAGGAGCATTTG 3' (配列番号: 13)

リバースプライマー 5' CCTGGAGTCCAGCAGACTCAA3' (配列番号: 14)

プローブ 5' TCAGGATGCGGCTGAGGCGTGT3' (配列番号: 15)

インターロイキン-10遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブの他のヌクレオチド配列 (b) は次の通りである。

フォワードプライマー 5' AGAGACTTGCTCTTGCACTACC AA3' (配列番号: 28)

リバースプライマー 5' GTAAGAGCAGGCAGCATAGCAGT3' (配列番号: 29)

プローブ 5' TGAGCCAGGCATGATGGAGCTCTTT3' (配列番号: 30)

【0015】(4) インターロイキン-12 p35サブユニットをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a) 前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12 p35サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド571～594の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド693～714の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド657～680の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは (b) 前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12 p35サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド62～81の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド208～229の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド118～143の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0016】インターロイキン-12 p35サブユニットをコードする遺伝子上のプライマー結合部位とプローブ結合部位との位置関係を図4のDに示す。この図において、3本の下線の意味は図2の(A)について記載した通りである。インターロイキン-12 p35サブユニット遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列 (a) は次の通りである。

フォワードプライマー 5' ATCATTCTAGACAAGGGCATGCTG3' (配列番号: 16)

リバースプライマー 5' GTGAAGCAGGATGCAGAGCTTC3' (配列番号: 17)

プローブ 5' TAAGGGTCTGCTTCTGCTTCTCCACAGGA3' (配列番号: 18)

インターロイキン-12 p35サブユニット遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブの他のヌクレオチド配列 (b) は次の通りである。

フォワードプライマー 5' CCAAGGTCAGCGTTCCAACA3' (配列番号: 31)

リバースプライマー 5' TAAGACACCTGGCAGGTCCAGA3' (配列番号: 32)

プローブ 5' CGGTCCAGCATGTGTCAATCACGCTA3' (配列番号: 33)

【0017】(5) インターロイキン-12 p40サブユニットをコードするmRNA又はcDNAを測定するために、(a) 前記一方のプライマーとしてインターロ



イキン-12p40サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド600~619の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド739~760の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド701~726の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い；あるいは、(b) 前記一方のプライマーとしてインターロイキン-12p40サブユニットをコードする核酸中のヌクレオチド199~221の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、他方のプライマーとして前記核酸中のヌクレオチド430~449の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用い、そして前記プローブとして前記核酸中のヌクレオチド333~358の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを用いる。

【0018】インターロイキン-12p40サブユニットをコードする遺伝子上のプライマー結合部位とプローブ結合部位との位置関係を図5の(E)に示す。この図において3本の下線の意味は図2の(A)に記載した通りである。インターロイキン-12p40サブユニット遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列(a)は次の通りである。

フォワードプライマー2 5' TGCCTGCCAGGAGGATGTC3' (配列番号: 19)

リバースプライマー 5' CTCATCTGCAAGTTCTTGGGC3' (配列番号: 20)

プローブ 5' ATGATGTCCCTGATGAAGAAGCTGGT3' (配列番号: 21)

インターロイキン-12p40サブユニット遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブの他のヌクレオチド配列(b)は次の通りである。

フォワードプライマー2 5' AGATGACATCACCTGGACCTCAG3' (配列番号: 34)

リバースプライマー 5' ACGTGAACCGTCCGGAGTAA3' (配列番号: 35)

プローブ 5' TTCCTTCTGTGGAGCAGCAGATGTG3' (配列番号: 36)

【0019】本発明においてはさらに、ヌクレオチド配列が知られている核酸を特異的に測定することができることが確認されているプライマー及びプローブを用いて該核酸を測定し、これを対照として用いることができる。この様な対照としてグリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子を用いることができる。この場合、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子中の、一方のプライマーとしてヌクレオチド46~67の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使用し、他方のプライマーとしてヌクレオチド252~271の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドを使

用し、そしてプローブとしてヌクレオチド222~242の領域のオリゴヌクレオチドを用いて、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ遺伝子を測定する。

【0020】グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼをコードする遺伝子上のプライマーとプローブとの位置関係を図6の(F)に示す。この図において、3本の下線を付した領域の意味は図2の(A)について記載した通りである。グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ遺伝子測定用の好ましいプライマー及びプローブのヌクレオチド配列は次の通りである。

フォワードプライマー 5' AATGGTGAAGGTCGGTGTGAAC3' (配列番号: 22)

リバースプライマー 5' GAAGATGGTGATGGGCTTCC3' (配列番号: 23)

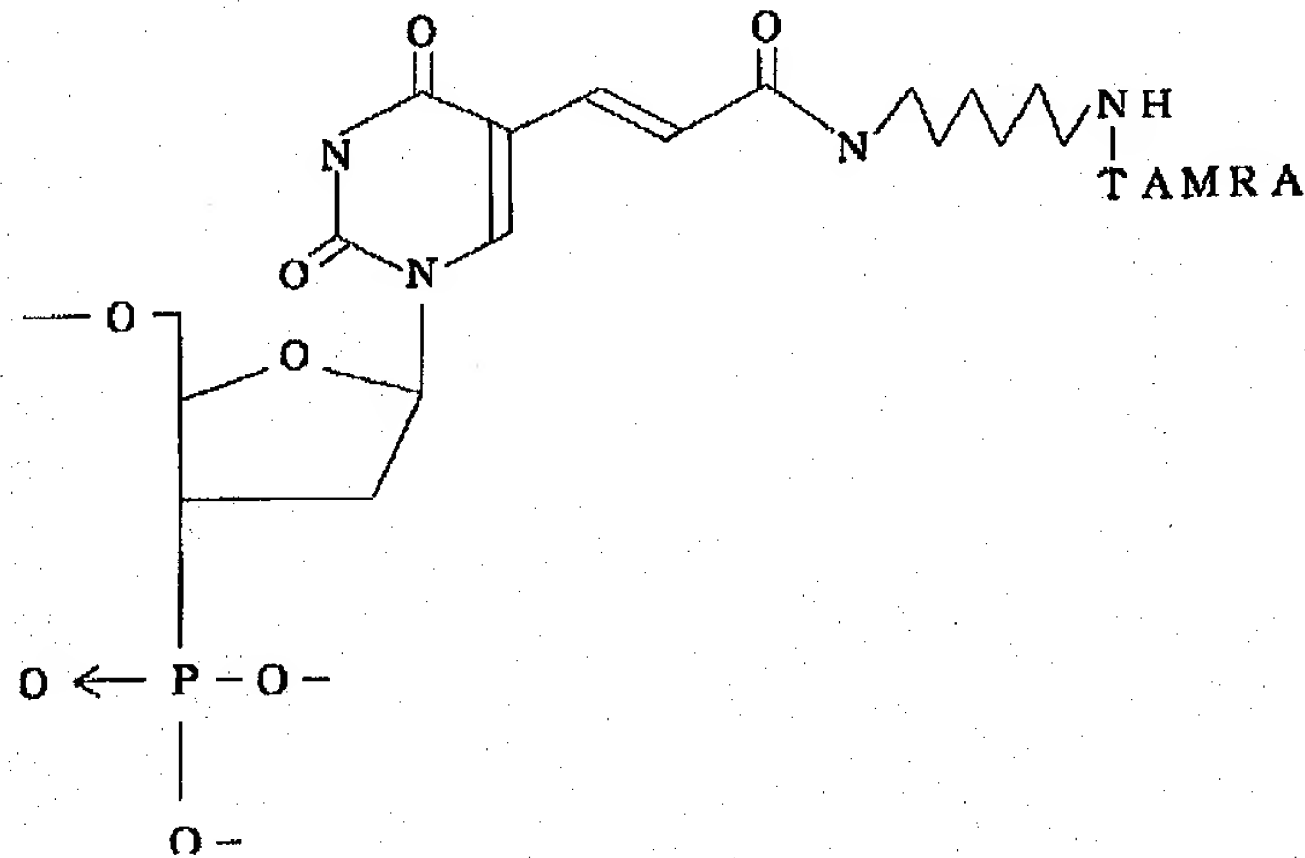
プローブ 5' CAAGCTTCCCATTCTCGGCC3' (配列番号: 24)

【0021】上記の種々のプライマー及びプローブ用のオリゴヌクレオチドのヌクレオチド数は15~35個、そして好ましくは20~30個である。プライマー及びプローブのサイズが長ければ、1本鎖DNAにハイブリダイズしにくくなり、短かすぎればハイブリダイゼーションの特異性が低下するからである。プライマー及びプローブの上記の特定のヌクレオチド配列は特に好ましい配列であるが、例えば20ヌクレオチドからなるプライマー又はプローブは、鋳型鎖との間に少数のミスマッチが存在してもハイブリダイズし、PCRのプライマーとして、又は検出用プローブとして機能し得ることが知られている。従って本発明プライマー及びプローブは、上記の特定のヌクレオチド配列を有するものに限定されず、例えば上記の具体的なヌクレオチド配列に対して4個以下のヌクレオチドの置換、欠失及び／又は付加により修飾されており、且つ所定の領域にハイブリダイズすることができるプライマー及びプローブも本発明に含まれる。

【0022】本発明に用いるプローブはその一端、例えば5'-末端にレポーター色素を結合しており、そして他端、例えば3'-末端にクエンチャー色素を結合している。レポーター色素が例えば紫外線の照射によって蛍光を発する物質であるのに対して、クエンチャーは、該レポーター色素に距離的に接近して存在する場合レポーター色素に作用して蛍光の発生を消去する作用を有するものである。レポーター色素としては、例えば6-カルボキシフルオレッセイン(FAM)、テトラクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン(TET)、2,7-ジメトキシ-4,5-ジクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン(JOE)、ヘキソクロロ-6-カルボキシフルオレッセイン(HEX)等が挙げられ、他方クエンチャー色素としては6-カルボキシ-テトラメチル-ロ

ーダミン (TAMRA) 等が使用される。

【0023】プローブオリゴヌクレオチドへのレポーター色素及びクエンチャー色素の結合は、例えばプローブの5'側は、通常数個のメチレン鎖をリンカーとし、末端のリン酸基にFAM分子をリン酸エステルで結合 \*



により行うことができる。

【0025】本発明の方法は、本発明が対象とする前記のサイトカインの発現量の測定方法として、mRNAを測定する場合に特に有用である。この場合は、特定のサイトカインの発現を測定しようとする生物体の組織を採取し、常法に従ってmRNAを抽出し、次にそれに対して相補性のcDNAを常法に従って合成した後、本発明のプライマーとプローブを用いて、PCRを行えばよい。本発明はさらに、上記の方法の実施のために使用されるキットをも提供する。このキットは上に定義したプライマー及びプローブを含んで成る。本発明のキットはさらに、対照として使用する核酸及びその核酸を測定するためのプライマー及びプローブを含んでいてもよい。

【0026】本発明の測定対象となる遺伝子がコードしているサイトカインは、次のごとくアレルギーに関連している。

IL-2: T細胞増殖因子としての働きがあり、遅延型アレルギーにおいて重要な働きをされると考えられているTh1系の細胞の増殖を誘導するため、これを評価することにより、化学物質のアレルギーの誘導性を評価できると考えられる。

IL-10: Th1系の細胞の増殖を制御する働きがあるとされており、このサイトカインが負の方向に変化することにより、Th1系の細胞の増殖の抑制が解除されることを指標として、アレルギー性の評価に役に立つ可能性が考えられる。

【0027】IL-12: IL-12はp40とp35 2つのサブユニットからなるヘテロダイマーで、Th0細胞からTh1細胞への分化を誘導する。このため、Th1系の細胞への誘導を評価することにより、アレルギー性の評価に役に立つと考えられる。

\* し、また、3'側については下に示す構造単位を介し、アミド結合によりTAMRA分子を結合する。

【0024】

【化1】

※ IFN- $\gamma$ : Th1系の細胞から産生されるサイトカインであるため、これを評価することにより、Th1系の細胞の活性化が評価でき、アレルギー性の評価に役に立つと考えられる。従って、例えばアレルギー性を評価しようとする物質を、実験動物、例えばマウスに投与し、該動物からリンパ節細胞を採取して培養し、次にこの培養細胞からmRNAを抽出し、本発明の方法によりその測定を行うことにより、前記被験物質のアレルギー性を評価することができる。

【0028】

30 【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 一般的方法

##### RNAの単離

細胞を2.2mlのチューブに入れ、2000Xg、5分間、4℃で遠心を行い培養液を除去する。残った細胞にISOGEN (ニッポンジーン) を1ml加え、攪拌し室温で5分間放置する。0.2mlのクロロホルムを加え、15秒間攪拌を行う。2-3分間、室温で放置後12000Xg、15分間、4℃で遠心後水層を別のチューブに移す。それに0.5mlのイソプロパノールを加え、5-10分間室温で放置後12000Xg、10分間、4℃で遠心を行い、沈殿物を得る。得られた沈殿物に75%エタノールを加え、12000Xg、5分間、4℃で遠心を行い、沈殿物を得る。沈殿物を風乾後、蒸留水に溶かす (この溶液をRNA溶液とする。)

##### 【0029】cDNAの合成

1 $\mu$ lのRNAを含むRNA溶液10.5 $\mu$ lに5XF first Strand Buffer (Gibco BRL) 4 $\mu$ l、0.1M DTT (Gibco BRL) 2 $\mu$ l、0.5mg/ml oligo (dT) 12-18

Primer (Gibco BRL) 1  $\mu$ l、2.5mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (宝酒造) 1  $\mu$ l、124U/ $\mu$ l RNase Inhibitor (宝酒造) 0.5  $\mu$ l、200U/ $\mu$ l M-MLV Reverse Transcriptase (Gibco BRL) 1  $\mu$ lの混合液を室温で10分間放置後、37℃で50分間インキュベートする。

#### 【0030】cDNAの測定

cDNA 5  $\mu$ l、10XPCR緩衝液 (Perkin Elmer) 5  $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub> (Perkin Elmer) 7  $\mu$ l、20  $\mu$ M フォワードプライマー 0.75  $\mu$ l、20  $\mu$ M リバースプライマー 0.75  $\mu$ l、3  $\mu$ M プローブ 5  $\mu$ l、2.5mM dATP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、2.5mM dGTP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、2.5mM dCTP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、5mM dUTP (Perkin Elmer) 1  $\mu$ l、蒸留水 21.75  $\mu$ l、AmpErase<sup>®</sup> UNG (Perkin Elmer) 0.5  $\mu$ l、Ampli Taq<sup>®</sup> DNA Polymerase (Perkin Elmer) 0.25  $\mu$ lの混合液をABI PRISM7700 (Perkin Elmer) にセットし、PCR反応を行う。温度条件は、50℃で2分間、95℃で10分間で保温した後、(95℃で15秒間、64.5℃で1分間)のサイクルを40回行い、各サイクルごとに蛍光強度を測定する。

#### 【0031】実施例1. 各サイトカインをコードする遺伝子の測定における標準曲線

各サイトカインをコードする遺伝子(鑄型)の初期分子量(濃度)と、蛍光強度がベースラインから離脱して増加し始めるまでのPCRのサイクル数(Threshold Cycle) C<sub>t</sub>との関係を試験した。鑄型遺伝子、フォワードプライマー、リバースプライマー及びプローブは次の通りであった。

##### インターロイキン-2遺伝子 (a)

鑄型: マウスインターロイキン-2 (Nature 313 (600) 402-404 (1985))

フォワードプライマー: 配列番号: 7

リバースプライマー: 配列番号: 8

プローブ: 配列番号: 9

レポーター色素: FAM

クエンチャー色素: TAMRA

##### インターロイキン-2遺伝子 (b)

鑄型: マウスインターロイキン-2 (Nature 313 (600) 402-404 (1985))

フォワードプライマー: 配列番号: 25

リバースプライマー: 配列番号: 26

プローブ: 配列番号: 27

レポーター色素: FAM

クエンチャー色素: TAMRA

#### 【0032】インターフェロン $\gamma$ 遺伝子

鑄型: マウスインターフェロン $\gamma$  (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 80, 5842-5846 (1983))

フォワードプライマー: 配列番号: 10

リバースプライマー: 配列番号: 11

プローブ: 配列番号: 12

レポーター色素: FAM

10 クエンチャー色素: TAMRA

##### インターロイキン-10遺伝子 (a)

鑄型: マウスインターロイキン-10 (Science 248: 1230-1234 (1990))

フォワードプライマー: 配列番号: 13

リバースプライマー: 配列番号: 14

プローブ: 配列番号: 15

レポーター色素: FAM

クエンチャー色素: TAMRA

##### インターロイキン-10遺伝子 (b)

20 鑄型: マウスインターロイキン-10 (Science 248: 1230-1234 (1990))

フォワードプライマー: 配列番号: 28

リバースプライマー: 配列番号: 29

プローブ: 配列番号: 30

レポーター色素: FAM

クエンチャー色素: TAMRA

#### 【0033】インターロイキン-12 p35サブユニット (a)

鑄型: マウスインターロイキン-12 (J. Immunol. 148, 3433-3440 (1992))

30 フォワードプライマー: 配列番号: 16

リバースプライマー: 配列番号: 17

プローブ: 配列番号: 18

レポーター色素: FAM

クエンチャー色素: TAMRA

##### インターロイキン-12 p35サブユニット (b)

鑄型: マウスインターロイキン-12 (J. Immunol. 148, 3433-3440 (1992))

フォワードプライマー: 配列番号: 31

40 リバースプライマー: 配列番号: 32

プローブ: 配列番号: 33

レポーター色素: FAM

クエンチャー色素: TAMRA

##### インターロイキン-12 p40サブユニット遺伝子

##### (a)

鑄型: マウスインターロイキン-12 (J. Immunol. 148, 3433-3440 (1992))

フォワードプライマー: 配列番号: 19

リバースプライマー: 配列番号: 20

50 プローブ: 配列番号: 21

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

インターロイキン-12p40サブユニット遺伝子

(b)

鋳型：マウスインターロイキン-12 (J. Immunol.

148, 3433-3440 (1992))

フォワードプライマー：配列番号：34

リバースプライマー：配列番号：35

プローブ：配列番号：36

レポーター色素：FAM

クエンチャー色素：TAMRA

【0034】結果を図7～図15に示す。これらの結

配列

ATCACCCCTG CTAATCACTC CTCACAGTGA CCTCAAGTCC TGCAGGCATG TACAGCATGC 60  
 AGCTCGCATC CTGTGTCACA TTGACACTTG TGCTCCTTGT CAACAGCGCA CCCACTTCAA 120  
 GCTCCACTTC AAGCTCTACA GCGGAAGCAC AGCAGCAGCA GCAGCAGCAG CAGCAGCAGC 180  
 AGCAGCACCT GGAGCAGCTG TTGATGGACC TACAGGAGCT CCTGAGCAGG ATGGAGAATT 240  
 ACAGGAACCT GAAACTCCCC AGGATGCTCA CCTTCAAATT TTAATTGCCC AAGCAGGCCA 300  
 CAGAATTGAA AGATCTTCAG TGCCTAGAAG ATGAACTTGG ACCTCTGCGG CATGTTCTGG 360  
 ATTTGACTCA AAGCAAAAGC TTTCAATTGG AAGATGCTGA GAATTTTCATC AGCAATATCA 420

【0036】配列番号：2

配列の長さ：180

配列の型：核酸

配列

AAGTTTGAGG TCAACAACCC ACAGGTCCAG CGCCAAGCAT TCAATGAGCT CATCCGAGTG 60  
 GTCCACCAGC TGTTGCCGGA ATCCAGCCTC AGGAAGCGGA AAAGGAGTCG CTGCTGATTC 120  
 GGGGTGGGGA AGAGATTGTC CCAATAAGAA TAATTCTGCC AGCACTATTT GAATTTTAA 180

【0037】配列番号：3

配列の長さ：660

配列の型：核酸

配列

GGGGGGGGG ATTTAGAGAC TTGCTCTTGC ACTACCAAAG CCACAAAGCA GCCTTGCAGA 60  
 AAAGAGAGCT CCATCATGCC TGGCTCAGCA CTGCTATGCT GCCTGCTCTT ACTGACTGGC 120  
 ATGAGGATCA GCAGGGGCCA GTACAGCCGG GAAGACAATA ACTGCACCCA CTTCCCAGTC 180  
 GGCCAGAGCC ACATGCTCCT AGAGCTGCGG ACTGCCTTCA GCCAGGTGAA GACTTTCCTT 240  
 CAAACAAAGG ACCAGCTGGA CAACATACTG CTAACCGACT CCTTAATGCA GGACTTTAAG 300  
 GGTACTTGG GTTGCCAAGC CTTATCGGAA ATGATCCAGT TTTACCTGGT AGAAGTGATG 360  
 CCCCAGGCAG AGAAGCATGG CCCAGAAATC AAGGAGCATT TGAATTCCTT GGGTGAGAAG 420  
 CTGAAGACCC TCAGGATGCG GCTGAGGCGC TGTCATCGAT TTCTCCCCTG TGAAAATAAG 480  
 AGCAAGGCAG TGGAGCAGGT GAAGAGTGAT TTTAATAAGC TCCAAGACCA AGGTGTCTAC 540  
 AAGGCCATGA ATGAATTTGA CATCTTCATC AACTGCATAG AAGCATACAT GATGATCAAA 600  
 ATGAAAAGCT AAAACACCTG CAGTGTGTAT TGAGTCTGCT GGACTCCAGG ACCTAGACAG 660

【0038】配列番号：4

配列の長さ：660

配列の型：核酸

配列

CCCAAGGTCA GCGTTCCAAC AGCCTCACCC TGGCATCCA GCAGCTCCTC TCAGTGCCGG 60  
 TCCAGCATGT GTCAATCACG CTACCTCCTC TTTTGGCCA CCCTTGCCCT CCTAAACCAC 120  
 CTCAGTTTGG CCAGGGTCAT TCCAGTCTCT GGACCTGCCA GGTGTCTTAG CCAGTCCCGA 180  
 AACCTGCTGA AGACCACAGA TGACATGGTG AAGACGGCCA GAGAAAACT GAAACATTAT 240

\* 果、いずれの遺伝子の測定においても核酸の分子数（濃度）とC<sub>T</sub>の間に直線関係があり、本発明の方法によって核酸の正確な測定が可能であることが明らかになった。

【0035】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：420

配列の型：核酸

10 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA

\*

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※

配列の種類：cDNA

★ 鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

★30

配列の種類：cDNA

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆

配列の種類：cDNA



21

22

TCCTGCACTG CTGAAGACAT CGATCATGAA GACATCACAC GGGACCAAAC CAGCACATTG 300  
 AAGACCTGTT TACCACTGGA ACTACACAAG AACGAGAGTT GCCTGGCTAC TAGAGAGACT 360  
 TCTTCCACAA CAAGAGGGAG CTGCCTGCCC CCACAGAAGA CGTCTTTGAT GATGACCCTG 420  
 TGCCTTGGA GCATCTATGA GGAATTGAAG ATGTACCAGA CAGAGTTCCA GGCCATCAAC 480  
 GCAGCACTTC AGAATCACAA CCATCAGCAG ATCATTCTAG ACAAGGGCAT GCTGGTGGCC 540  
 ATCGATGAGC TGATGCAGTC TCTGAATCAT AATGGCGAGA CTCTGCGCCA GAAACCTCCT 600  
 GTGGGAGAAG CAGACCCTTA CAGAGTGAAA ATGAAGCTCT GCATCCTGCT TCACGCCTTC 660

【0039】配列番号：5

配列の長さ：600

配列の型：核酸

\* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 10 配列の種類：cDNA

配列

CTGTGACACG CCTGAAGAAG ATGACATCAC CTGGACCTCA GACCAGAGAC ATGGAGTCAT 60  
 AGGCTCTGGA AAGACCCTGA CCATCACTGT CAAAGAGTTT CTAGATGCTG GCCAGTACAC 120  
 CTGCCACAAA GGAGGCGAGA CTCTGAGCCA CTCACATCTG CTGCTCCACA AGAAGGAAAA 180  
 TGGAAATTTGG TCCACTGAAA TTTTAAAAAA TTTCAAAAAC AAGACTTTCC TGAAGTGTGA 240  
 AGCACCAAAT TACTCCGAC GGTTCACGTG CTCATGGCTG GTGCAAAGAA ACATGGACTT 300  
 GAAGTTCAAC ATCAAGAGCA GTAGCAGTTC CCCTGACTCT CGGGCAGTGA CATGTGGAAT 360  
 GGCGTCTCTG TCTGCAGAGA AGGTCACACT GGACCAAAGG GACTATGAGA AGTATTTCAGT 420  
 GTCCTGCCAG GAGGATGTCA CCTGCCCAAC TGCCGAGGAG ACCCTGCCCA TTGAACTGGC 480  
 GTTGGAAGCA CGGCAGCAGA ATAAATATGA GAACTACAGC ACCAGCTTCT TCATCAGGGA 540  
 CATCATCAAA CCAGACCCGC CCAAGAACTT GCAGATGAAG CCTTTGAAGA ACTCACAGGT 600

【0040】配列番号：6

配列の長さ：300

配列の型：核酸

\* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：cDNA

配列

ACAGCCGCAT CTTCTTGTGC AGTGCCAGCC TCGTCCCGTA GACAAAATGG TGAAGGTCGG 60  
 TGTGAACGGA TTTGGCCGTA TTGGGCGCCT GGTACCAGG GCTGCCATTT GCAGTGGCAA 120  
 AGTGGAGATT GTTGCCATCA ACGACCCCTT CATTGACCTC AACTACATGG TCTACATGTT 180  
 CCAGTATGAC TCCACTCAGC GCAAATTCAG CGGCACAGTC AAGGCCGAGA ATGGGAAGCT 240  
 TGTCATCAAC GGGAAGCCCA TCACCATCTT CCAGGAGCGA GACCCCACTA ACATCAAATG 300

【0041】配列番号：7

配列の長さ：25

配列の型：核酸

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：Synthetic DNA

配列

TGATGGACCT ACAGGAGCTC CTGAG

25

【0042】配列番号：8

配列の長さ：25

配列の型：核酸

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：Synthetic DNA

配列

GAGTCAAATC CAGAACATGC CGCAG

25

【0043】配列番号：9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：Synthetic DNA

配列

CAGGAACCTG AAATCCCCA GGATGCT

27

【0044】配列番号：10

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

配列

GTCAACAACC CACAGGTCCA G

21

【0045】配列番号：11

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

TTGGGACAAT CTCTCCCCA

【0046】配列番号：12

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列

CGACTCCTTT TCCGCTTCCT GAG

【0047】配列番号：13

配列の長さ：22

配列の型：核酸鎖の数：一本鎖

配列

CCCAGAAATC AAGGAGCATT TG

【0048】配列番号：14

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

CCTGGAGTCC AGCAGACTCA A

【0049】配列番号：15

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列

TCAGGATGCG GCTGAGGCGC TGT

【0050】配列番号：16

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

ATCATTCTAG ACAAGGGCAT GCTG

【0051】配列番号：17

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

GTGAAGCAGG ATGCAGAGCT TC

【0052】配列番号：18

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

TAAGGGTCTG CTTCTGCTTC TCCCACAGGA

【0053】配列番号：19

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

TGTCTGCCA GGAGGATGTC

【0054】配列番号：20

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

CTTCATCTGC AAGTTCTTGG GC

\* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：Synthetic DNA

20

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：Synthetic DNA

23

★ トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

★

22

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：Synthetic DNA

21

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：Synthetic DNA

23

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

24

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

22

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

30

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

22

【0055】配列番号：21

配列の長さ：26

配列の型：核酸

配列

ATGATGTCCC TGATGAAGAA GCTGGT

【0056】配列番号：22

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

AATGGTGAAG GTCGGTGTGA AC

【0057】配列番号：23

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GAAGATGGTG ATGGGCTTCC

【0058】配列番号：24

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CAAGCTTCCC ATTCTCGGCC

【0059】配列番号：25

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

TCACAGTGAC CTCAAGTCCT GC

【0060】配列番号：26

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列

TGTTGACAAG GAGCACAAGT GTC

【0061】配列番号：27

配列の長さ：26

配列の型：核酸

配列

TGTACAGCAT GCAGCTCGCA TCCTGT

【0062】配列番号：28

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

AGAGACTTGC TCTTGCACTA CCAA

【0063】配列番号：29

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列

GTAAGAGCAG GCAGCATAGC AGT

【0064】配列番号：30

配列の長さ：26

配列の型：核酸

配列

TGAGCCAGGC ATGATGGAGC TCTCTT

\* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：Synthetic DNA

26

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：Synthetic DNA

22

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：Synthetic DNA

20

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：Synthetic DNA

20

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：Synthetic DNA

22

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

23

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

26

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

24

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

23

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

26

【0065】配列番号：31

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CCAAGGTCAG CGTTCCAACA

【0066】配列番号：32

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

TAAGACACCT GGCAGGTCCA GA

【0067】配列番号：33

配列の長さ：26

配列の型：核酸

配列

CGGTCCAGCA TGTGTCAATC ACGCTA

【0068】配列番号：34

配列の長さ：23

配列の型：核酸

配列

AGATGACATC ACCTGGACCT CAG

【0069】配列番号：35

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

ACGTGAACCG TCCGGAGTAA

【0070】配列番号：36

配列の長さ：26

配列の型：核酸

配列

TTCCTTCTTG TGGAGCAGCA GATGTG

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の測定法の原理を示す図である。

【図2】図2は、インターロイキン-2 (A) 及びインターフェロン- $\gamma$  (B) をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の1部分と、それに対するプライマー及びプローブの位置を示す図である。

【図3】図3は、インターロイキン-10 (C) をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の1部分と、それに対するプライマー及びプローブの位置を示す図である。

【図4】図4は、インターロイキン-12 p35サブユニット (D) をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の1部分と、それに対するプライマー及びプローブの位置を示す図である。

【図5】図5は、インターロイキン-12 p40サブユニット (E) をコードする遺伝子のヌクレオチド配列の1部分と、それに対するプライマー及びプローブの位置を示す図である。

【図6】図6は、グリセロアルデヒド-3-ホスフェート・デヒドロゲナーゼ (F) をコードする遺伝子のヌク

\* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

\* 配列の種類：Synthetic DNA

20

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：Synthetic DNA

22

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：Synthetic DNA

26

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：Synthetic DNA

23

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：Synthetic DNA

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Synthetic DNA

26

レオチド配列の1部分と、それに対するプライマー及びプローブの位置を示す図である。

【図7】図7は、インターロイキン-2をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

【図8】図8は、インターフェロン- $\gamma$ をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

40 【図9】図9は、インターロイキン-10をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

【図10】図10は、インターロイキン-12 p35サブユニットをコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

50 【図11】図11は、インターロイキン-12 p40サブユニットをコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

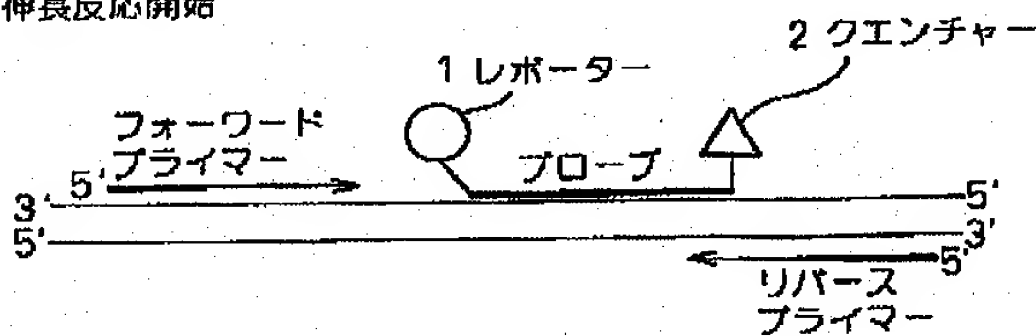


【図12】図12は、インターロイキン-2をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

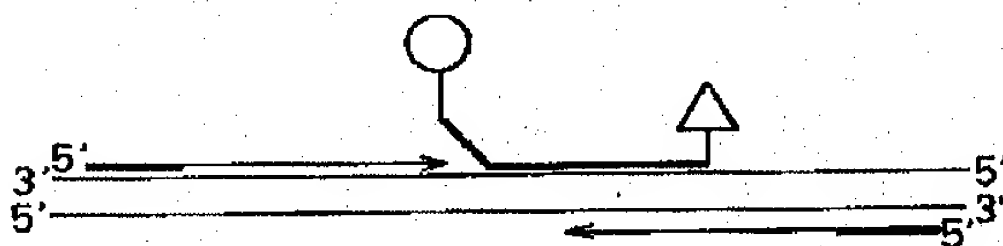
【図13】図13は、インターロイキン-10をコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

【図1】

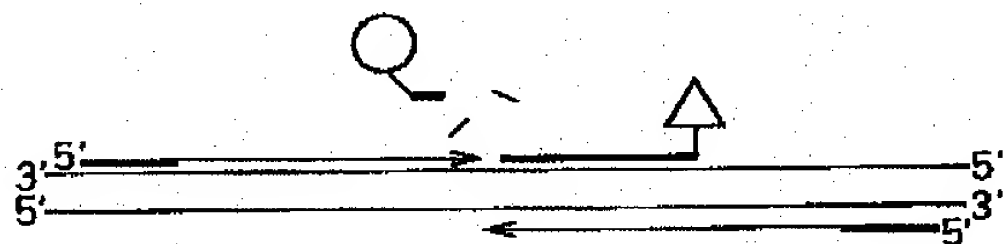
(A) 伸長反応開始



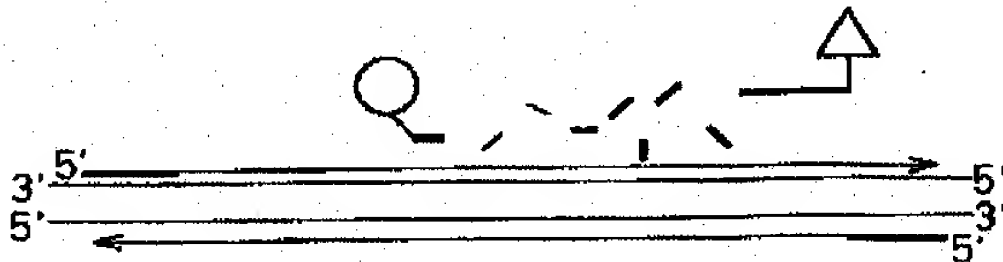
(B) 伸長反応



(C) 5' - 3' ヌクレアーゼ活性によるリポーター色素のプローブからの解離



(D) 伸長反応終了



【図2】

(A) IL-2 (配列番号: 1)

```

1  atcacccttg ctaatcactc ctacacagtga cctcaagtc tgcaggcatg tacagcatgc
61  agctggcatc ctgtgtcaca ttgacacttg tgctccttgt caacagcgca cccacttcaa
121 gctccacttc aagctctaca gcggaagcac agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc
181 agcagcacct ggagcagctg ttgaigggacc tacaggagct cctgagcagg atggagaatt
241 acaggaacct gaaactcccc aggatgctca cttcaaatt ttacttgccc aagcaggcca
301 cagaattgaa agatcttcag tgcttagaag atgaacttgg acctctgcgg catgttcttg
361 aittgactca aagcaaaagc tttaatttgg aagatgctga gaatttcac agcaatatca
  
```

(B) IFN- $\gamma$  (配列番号: 2)

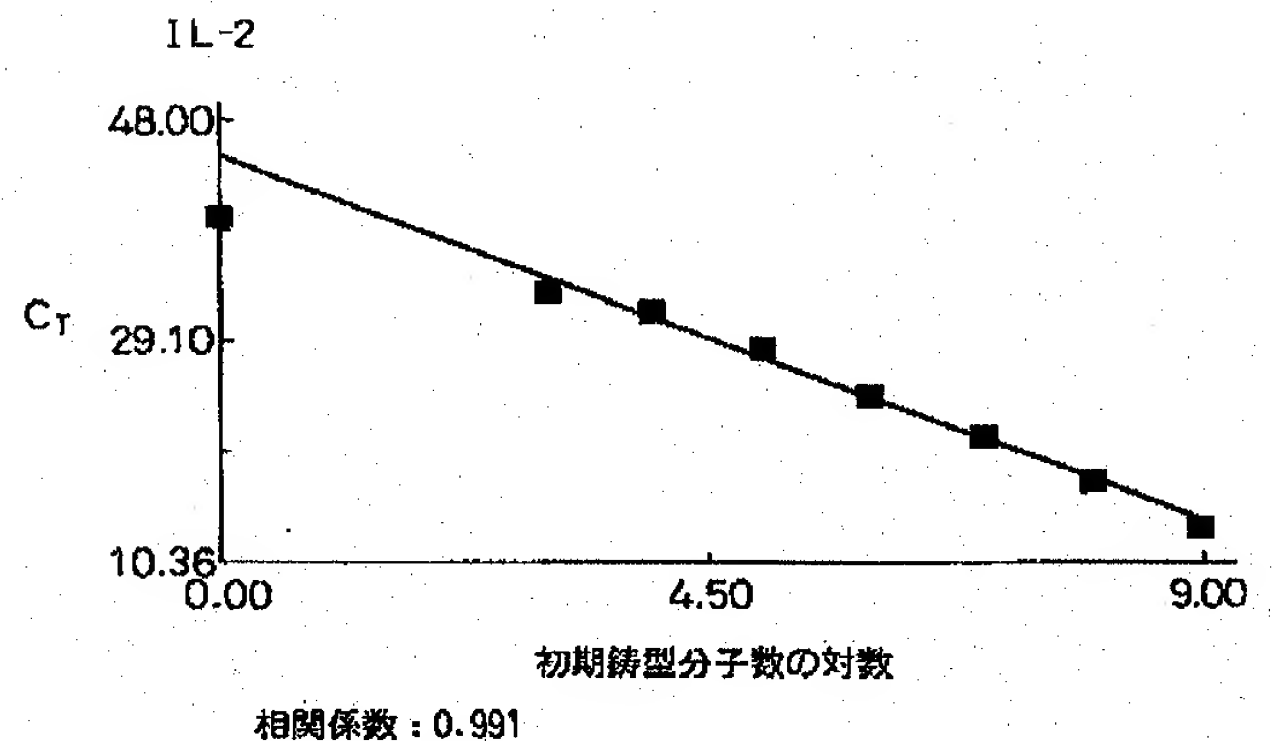
```

421 aagtttgagg tcaacaaccc acaggtccag cgccaagcat tcaatgagct catccgagtg
481 gtccaccagc tggtgccgga atccagcctc aggaagcgga aaaggagtcg ctgctgattc
541 ggggtgggga agagattgtc ccaataagaa taattctgcc agcactattt gaatttttaa
  
```

\* 【図14】図14は、インターロイキン-12 p35サブユニットをコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

【図15】図15は、インターロイキン-12 p40サブユニットをコードする遺伝子を本発明の方法により測定した場合の、鋳型核酸の初期分子数の対数と $C_T$ との関係を示すグラフである。

【図7】



## 【図3】

(C) IL-10 (配列番号: 3)

gggggggg atttagagac ttgctcttgc actaccaaag ccacaaagca gccttgcaga 60  
 aaagagagct ccatcatgcc tggctcagca ctgctatgct gcctgctctt actgactggc 120  
 atgaggatca gcaggggcca gtacagccgg gaagacaata actgcacca cttcccagtc 180  
 ggccagagcc acatgctcct agagctgcgg actgccttca gccaggtaga gactttcttt 240  
 caaacaagg accagctgga caacatactg ctaaccgact ccttaatgca ggacttiaag 300  
 ggttacttgg gttgccaaag cttatcgga atgatccagt ttacctggg agaagtgatg 360  
 cccagggcag agaagcatgg ccagaaatc aaggagcait tgaattccct gggtagaag 420  
 ctgaagacc tcaggatgcg gctgaggcgc tgcctatgat ttctcccctg tgaataaag 480  
 agcaaggcag tggagcaggt gaagagtga ttttaataag tccaagacca aggtgtctac 540  
 aaggccatga atgaattga catcttcatc aactgcatag aagcatacat gatgatcaaa 600  
 atgaaaagct aaacacctg cagtgtgtat tgagtctgct ggactccagg acctagacag 660

## 【図4】

(D) IL-12p35 (配列番号: 4)

61 cccaaggica gcgttccaac agcctcacc tggcatcca gcagctcctc tcagtccgg  
 121 tccagcatgt gtcaatcacg ctacctcctc ttttggcca ccttgccct cctaaaccac  
 181 ctcagtttgg ccagggtcat tccagtctct ggacctgcca ggtgtcttag ccagtccga  
 241 aacctgcga agaccacaga tgacatggg aagacggcca gaaaaaact gaaacattat  
 301 tctgcactg ctgaagacat cgtatgaa gacatcacac gggaccaaac cagcacatig  
 361 aagacctgtt taccactgga actacacaag aacgagagtt gcctggctac tagagagact  
 421 tcttcacaa caagaggag ctgcctgcc ccacagaaga cgtctttag gatgacctg  
 481 tgccttggta gcatctatga ggacttgaag atgtaccaga cagagttcca ggcacatcaac  
 541 gcagcacttc agaatacaaa ccatcagcag atcattctag acaaggcat gctgttgcc  
 601 atcgtgagc tgatgcagtc tctgaatcat aatggcgaga ctctgcgcca gaaacctcct  
 661 gtgggagaag cagaccctta cagagtgaag atgaagctct gcctcctgct tcacgccttc

## 【図5】

(E) IL-12p40 (配列番号: 5)

181 ctgtgacacg cctgaagaag atgacatcac ctggacctca gaccagagac atggagtcac  
 241 aggcctctgga aagacctga ccatcactgt caaagagttt ctgatgctg gccaglacac  
 301 ctgccacaaa ggaggcgaga ctctgagcca ctcacatctg ctgctccaca agaaggaaaa  
 361 tggaaatttg tccactgaaa ttttaaaaaa ttcaaaaac aagactttcc tgaagtgtga  
 421 agcaccaaat tactccggac ggttcacgtg ctcatggctg gtgcaaagaa acatggactt  
 481 gaagttaac atcaagagca gtagcagttc cctgactct cgggcagtga catgtggaat  
 541 ggcgtctctg tctgcagaga aggtcacact ggaccaaagg gactatgaga agtattcagt  
 601 gtcctgccag gaggatgtca cctgccaac tggcaggag accctgccca ttgaactggc  
 661 gttggaagca cggcagcaga ataaatatga gaactacagc accagcttct tcacagga  
 721 catcatcaaa ccagaccgc ccaagaactt gcagatgaag cccttgaaga actcacaggt

【図6】

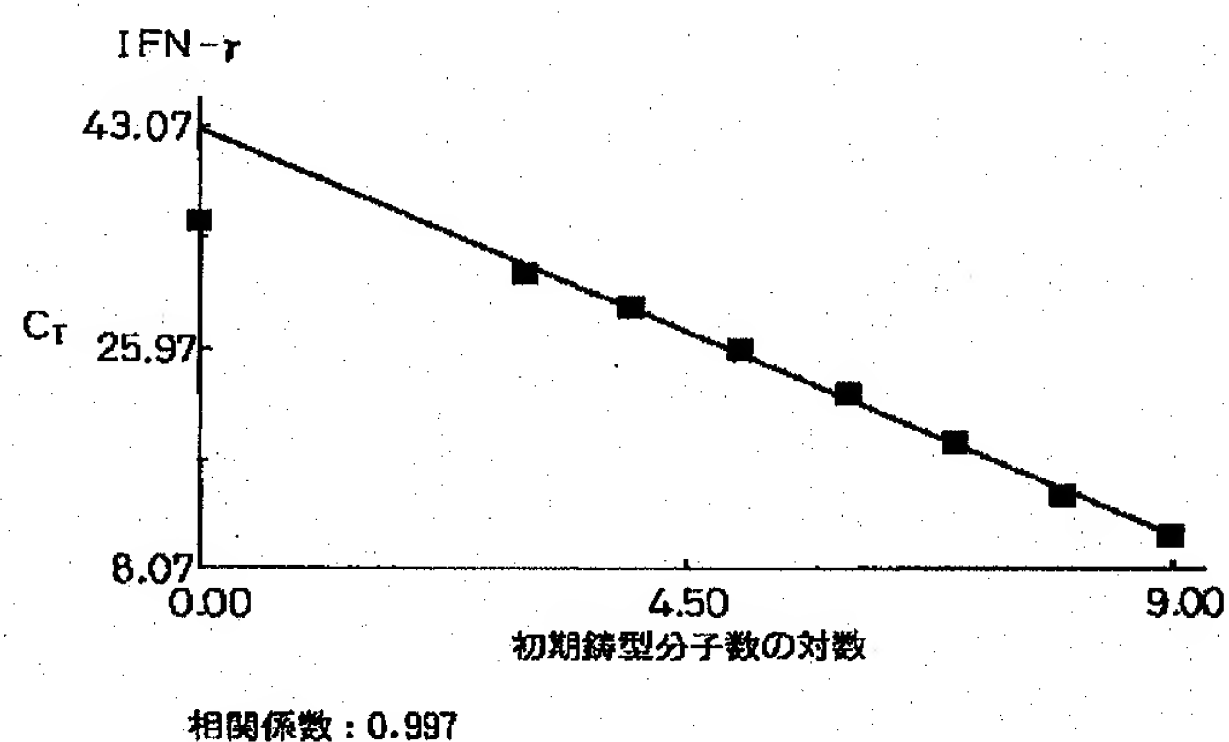
(F) GAPDH (配列番号: 6)

```

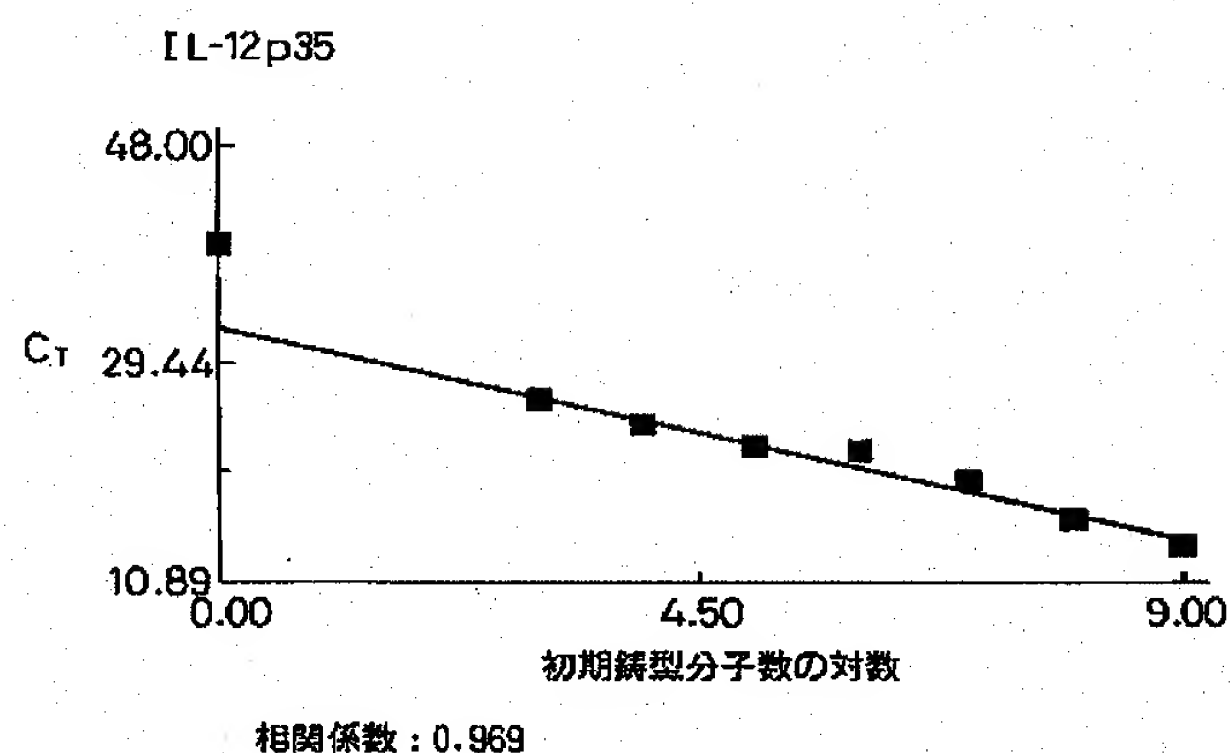
acagccgcat cttcttggtc agtgccagcc tcgtcccgta gacaaaatgg tgaaggtcgg 60
tgtgaacgga ttggccgta ttgggcgcct ggtcaccagg gctgccattt gcagtggcaa 120
agtggagatt gtggcatca acgacccctt cattgacctc aactacatgg tctacatgtt 180
ccagtaigac tccactcag gcaaattcaa cggcacagtc aaggccgaga atgggaagct 240
tgtcatcaac gggaagccca tcaccatctt ccaggagcga gaccccacta acatcaaatt 300

```

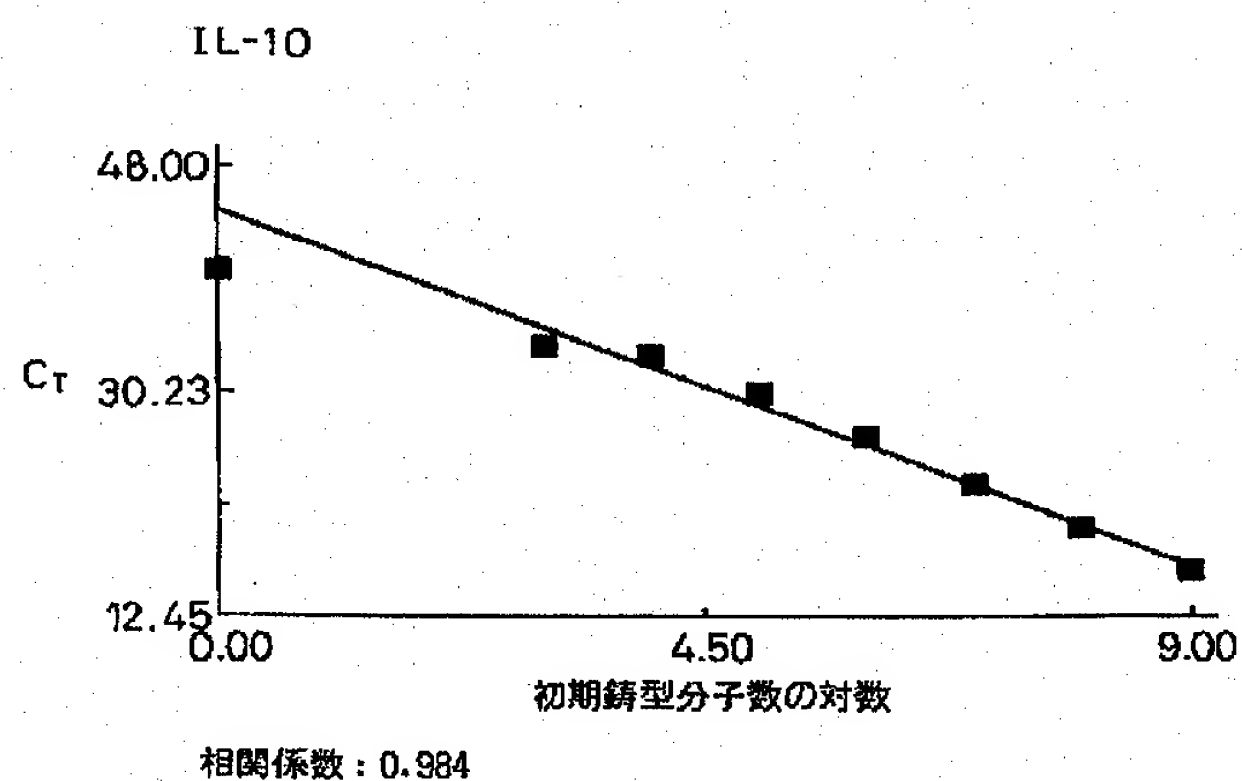
【図8】



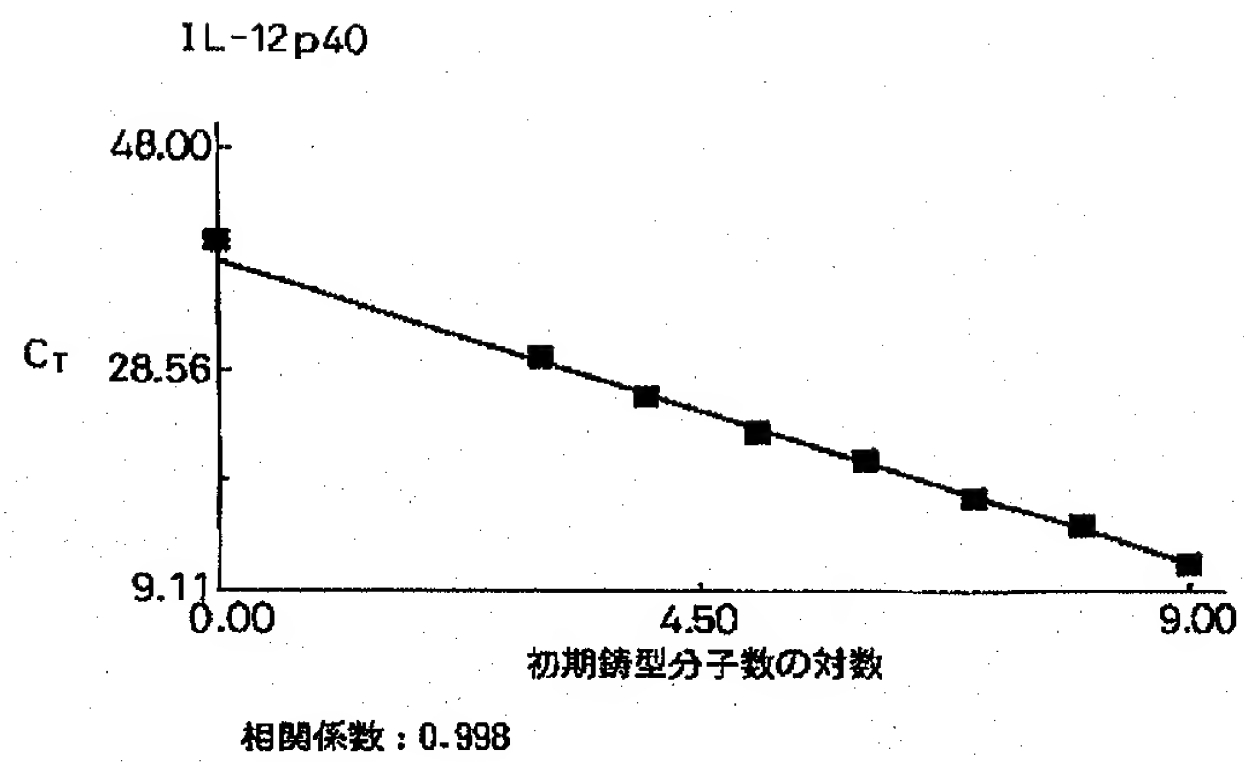
【図10】



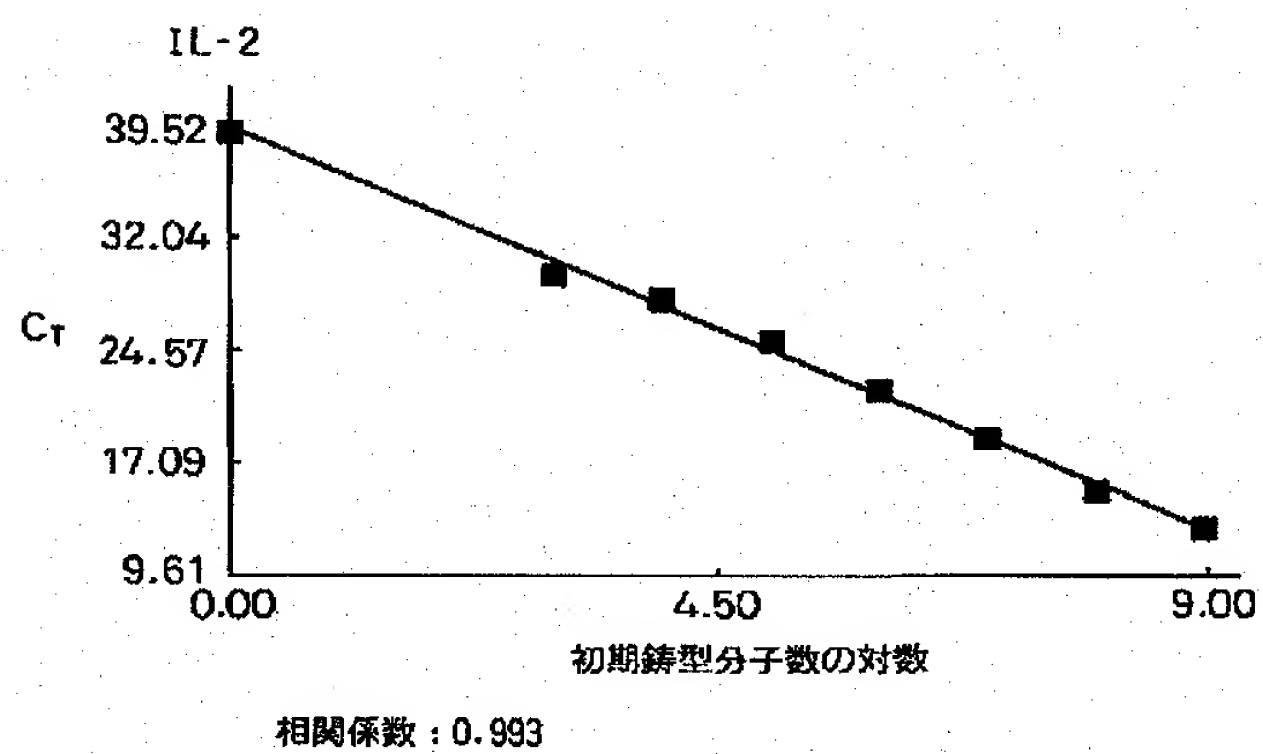
【図9】



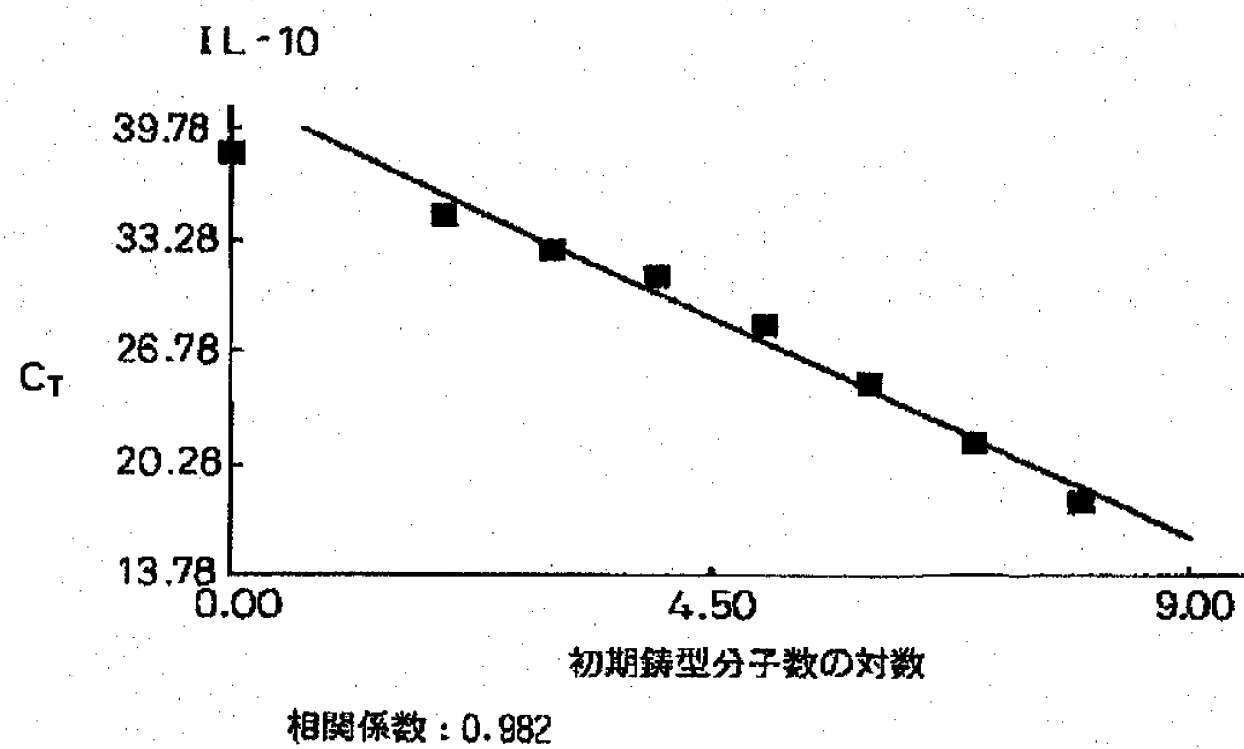
【図11】



【図12】

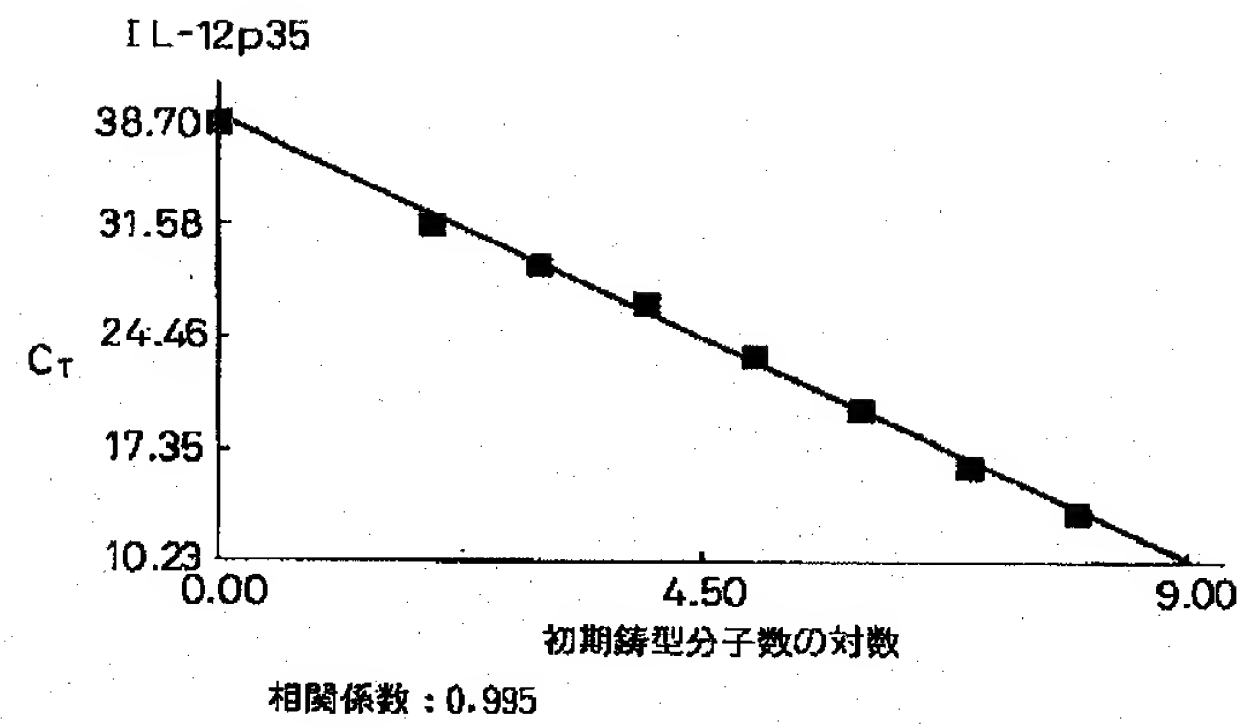


【図13】

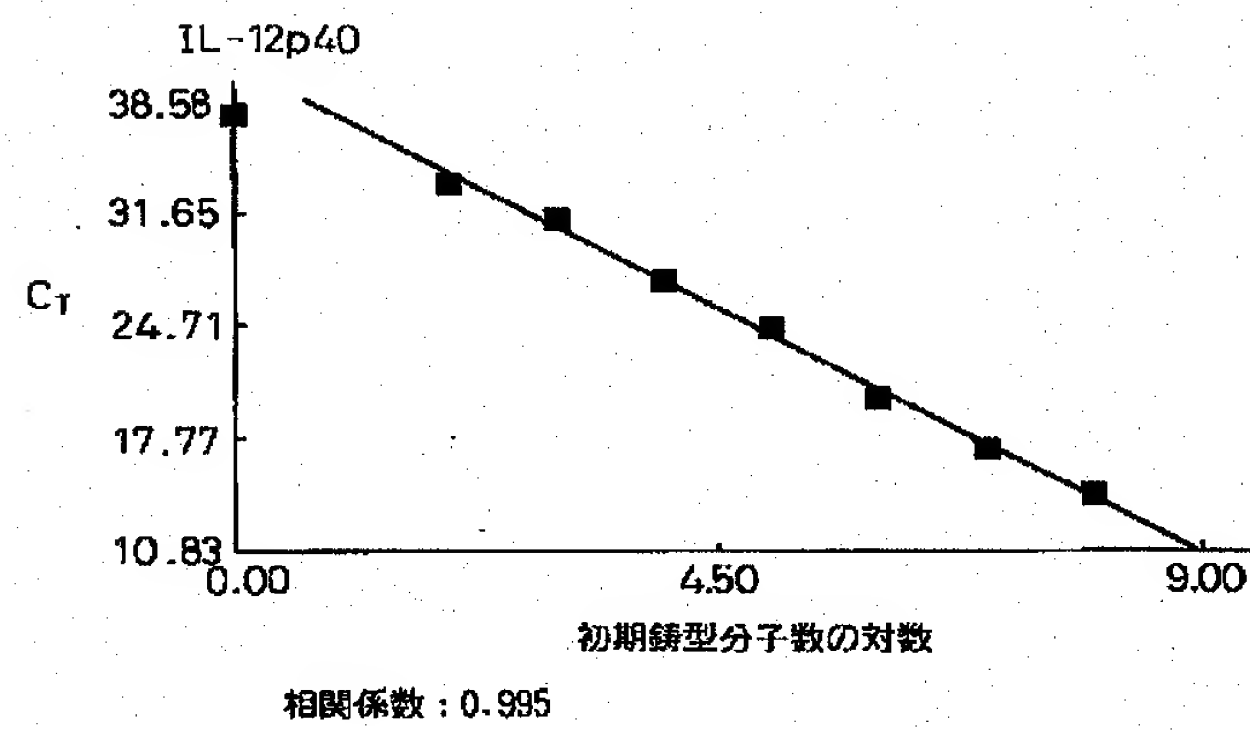




【図14】



【図15】



フロントページの続き

(72)発明者 津田 孝也  
神奈川県横浜市港北区新羽町1050 株式会  
社資生堂第一リサーチセンター内

(72)発明者 柴田 道男  
神奈川県横浜市港北区新羽町1050 株式会  
社資生堂第一リサーチセンター内